

PCT

世界知的所有権機関  
国際事務局



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 <sup>4</sup> A61L 27/00		A1	(11) 国際公開番号 WO 89/ 08465
			(43) 国際公開日 1989年9月21日 (21.09.89)
(21) 国際出願番号 PCT/JP89/00257 (22) 国際出願日 1989年3月9日 (09. 03. 89) (31) 優先権主張番号 特願昭 63-53837 特願昭 63-183478 特願昭 63-183479 特願昭 63-221337 (32) 優先日 1988年3月9日 (09. 03. 88) 1988年7月25日 (25. 07. 88) 1988年7月25日 (25. 07. 88) 1988年9月6日 (06. 09. 88) (33) 優先権主張国 JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) テルモ株式会社 (TERUMO KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP] 〒151 東京都渋谷区幡ヶ谷 2丁目44番1号 Tokyo, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 吉里勝利 (YOSHISATO, Katsutoshi) [JP/JP] 〒243-04 神奈川県海老名市大谷 40-1-518 Kanagawa, (JP) 小西 淳 (KONISHI, Jun) [JP/JP] 小出幹夫 (KOIDE, Mikio) [JP/JP] 〒417 静岡県富士市大淵 2656番地の1 テルモ株式会社内 Shizuoka, (JP)		小山田香 (OYAMADA, Kaoru) [JP/JP] 大崎建一 (OHSAKI, Kenichi) [JP/JP] 片倉健男 (KATAKURA, Takeo) [JP/JP] 建部 建 (TATEBE, Ken) [JP/JP] 〒417 静岡県富士市大淵 2656番地の1 テルモ株式会社内 Shizuoka, (JP) 森 有一 (MORI, Yuichi) [JP/JP] 〒151 東京都渋谷区幡ヶ谷 3丁目71番11号 Tokyo, (JP) (74) 代理人 弁理士 鈴江武彦, 外 (SUZUYE, Takehiko et al.) 〒100 東京都千代田区役が岡 3丁目7番2号 Tokyo, (JP) (81) 指定国 AU, BE (欧州特許), DE (欧州特許), FR (欧州特許), GB (欧州特許), IT (欧州特許), NL (欧州特許), SE (欧州特許), US. 添付公開書類 国際調査報告書	
(54) Title: MEDICAL MATERIAL PERMITTING CELLS TO ENTER THEREINTO AND ARTIFICIAL SKIN			
(54) 発明の名称 細胞が侵入可能な医療材料および人工皮膚			
(57) Abstract  A medical material permitting cells to enter thereinto which contains modified collagen including 0 to 80 % of helix and a carrier showing a higher resistance against enzymatic decomposition than the collagen is disclosed. An artificial skin using this medical material as a wound-contacting layer and a process adapted for producing it are also disclosed.			

(57) 要約

ヘリックス含有率 0～80%の変性コラーゲンと、該変性コラーゲンよりも酵素分解に対して高い抵抗性を有する担体物質とを含有することを特徴とする細胞が侵入可能な医療用材料が開示される。また、この医療用材料を創傷接触層に用いた人工皮膚と、その好適な製造方法が開示される。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AT	オーストリア	FR	フランス	MR	モーリタニア
AU	オーストラリア	GA	ガボン	MW	マラウイ
BB	バルバドス	GB	イギリス	NL	オランダ
BE	ベルギー	HU	ハンガリー	NO	ノルウェー
BG	ブルガリア	IT	イタリア	RO	ルーマニア
BJ	ベナン	JP	日本	SD	スーダン
BR	ブラジル	KP	朝鮮民主主義人民共和国	SE	スウェーデン
CF	中央アフリカ共和国	KR	大韓民国	SN	セネガル
CG	コンゴ	LI	リヒテンシュタイン	SU	ソビエト連邦
CH	スイス	LK	スリランカ	TD	チャード
CM	カメルーン	LU	ルクセンブルグ	TG	トーゴ
DE	西ドイツ	MC	モナコ	US	米国
DK	デンマーク	MG	マダガスカル		
FI	フィンランド	ML	マリ		

## 明 細 書

## 細胞が侵入可能な医療材料および人工皮膚

## 〔技術分野〕

本発明は細胞が侵入可能で生体組織と同化され易く、人工組織としての使用に適した医療用材料に関する。また、本発明はこの医療用材料の人工皮膚への適用に関する。

## 〔背景技術〕

生体組織の一部に生じた欠損、または不可逆的な機能喪失の治療法として、組織移植は極めて効果的である。この場合、拒否反応として知られる免疫適合性の問題を回避するためには同種移植、即ち、患者自身の他部位または親族から得られた組織を移植するのが好ましい。しかし、常にこのような好ましい移植組織が入手可能であるとは限らない。そこで、移植可能な人工組織を提供するための研究が従来から行なわれている。

拒絶反応を生じない人工組織を得るための第一のアプローチは、組織反応性の低い材料、即ち、組織および免疫細胞系を感作(sensitize)しない材料を提供することである。ポリウレタンに代表される合成高分子材料の疎水性を更に高める研究は、このアプローチに属する。

第二のアプローチは、免疫反応を惹起する前に速やかに組織と同化することによって、器官として機能する材料を提供することである。より具体的には、生体由来のコラーゲン等からなる材料を用い、その内部に線維芽細胞等の組織修復機能をもった細胞を侵入させることにより、結合組織に類似し

た組織を構築させる。こうして形成された新たな組織はもはや非自己ではないから、免疫不適合を生じることはない。従って、このアプローチの方がより理想に近いといえることができる。

しかし、上記第二のアプローチには次のような欠点がある。

コラーゲン等の生体由来物質からなる人工材料は、細胞組織に対する親和性は高いものの、生体内においてコラゲナーゼ等の酵素により容易に分解され、吸収される。このため、線維芽細胞等が侵入して新たな組織が構築されるまでの時間を十分に確保できない。そこで、何等かの手段によって架橋構造を導入し、コラーゲンによる分解に抵抗するように物性を強化する必要がある。そのための架橋法としては、加熱による脱水架橋、薬品を用いた化学的架橋法を用いることができる。このうち加熱による脱水架橋は、薬品処理に比較して安全性が高いが、コラゲナーゼ酵素に対する耐性の点で化学的架橋より劣る。従って、一般には化学的架橋を単独で、または化学的架橋と加熱脱水架橋とを併用して用いる方法が行なわれている。

上記の方法でコラーゲンに架橋構造を導入することにより、コラゲナーゼに対する耐性は著しく向上する。例えば、加熱脱水（真空下に110℃で24時間放置）により架橋構造を導入したコラーゲンは、3 unit/mlのコラゲナーゼ溶液中に37℃で静置すると、1日以内に溶解する。これに対し、イソシアネート系の化学的架橋剤を用いて架橋構造を導入したコラーゲンは、これを1000unit/mlのコラゲナーゼ溶液中に37℃で

静置した場合、7日経過した後でも形態の変化は見られない。

一方、上記のように強力な架橋構造を導入すると、コラーゲンが本来的に有していた細胞や組織に対する良好な親和性が大幅に低下する。このため細胞の侵入が阻止され、所期の新たな組織が形成されなくなる問題が生じる。

上記のように、コラーゲンのような生体由来材料において、良好な酵素耐性と、細胞または組織に対する良好な親和性の両方を満足することは困難である。このため、前記第二のアプローチは極めて魅力的なものではあるが、これを実現するための満足できる医療用材料は未だ開発されていない。

ところで、上記の細胞が侵入可能な医療用材料は、埋め込み人工臓器の被覆材や人工血管として極めて有用と考えられる。しかし、より現実的かつ効果的な用途としては、人工皮膚としての使用が挙げられる。

人工皮膚は、熱傷等により皮膚組織が損失した場合、細菌感染および体液の流出を防止するために、一時的または永続的な患部被覆のために用いられる人工医療材料である。即ち、人工皮膚は自家移植皮膚の代替品である。

人工皮膚と同様の目的で使用される創傷被覆材として、従来からガーゼ、脱脂綿等が用いられている。しかし、これらは細菌感染防止性能が低く、且つ滲出液を速やかに吸収するため創面が乾燥してしまい、除去する際に痛みや出血等を伴う欠点がある。これを回避するために軟膏等を併用することも行なわれているが、この場合には逆に滲出液の吸収が不十分で、創面が過度に湿った状態になる欠点がある。

また、創面が広範囲に亙る場合には、次のような被覆膜が用いられている。第一のカテゴリーは、シリコーン製ガーゼ、シリコーンゴム膜、ペロアー状の表面構造を有するナイロン若しくはテフロン等の合成繊維シート、その他の合成材料である。第二のカテゴリーは、凍結乾燥豚皮、キチン不織布、コラーゲン膜、ポリアミノ酸スポンジ、ムコ多糖類複合コラーゲン膜、その他の生体由来材料である。

しかし、上記の合成材料からなる被覆膜は患部との密着性および水蒸気透過性に劣り、またひび割れを起し易い等の欠点を有している。また、上記の生体由来材料からなる被覆膜は、比較的良好な生体適合性を有しているものの、原料が入手し難い。更に、その多くは抗原性を有し、また細菌感染や滲出液により劣化し易い等の欠点がある。

上記の被覆膜に加え、最近ではコラーゲン処理したナイロンメッシュとシリコーン膜とからなる複合膜が開発され、既に実用化されている。この複合膜は創面に対する良好な密着性を有し、また適度な水分透過性を有している。しかし、治癒の過程でナイロンメッシュ中に肉芽組織が入り込むため、複合膜は創面に固着する。しかも、ナイロンメッシュは分解されることなく肉芽組織中に残存するから、治癒後に複合膜を除去する際、著しい苦痛を伴う欠点がある。

#### [発明の開示]

本発明の第一の目的は、分解酵素に対して所望の抵抗性を有するため、生体内の環境において一定の期間は必要な機械的強度を保持し得る一方、細胞および組織に対する親和性

が良好であり、細胞が容易に侵入することができる医療用材料を提供することである。

本発明の第二の目的は、上記の医療用材料を用いることにより、自家移植皮膚の代替品として十分な機能を有する人工皮膚と、その製造方法を提供することである。即ち、本発明が目的とする人工皮膚は、創面を一時的または永続的に被覆して細菌感染および体液の流出を防止し得、且つ細胞増殖による組織修復を十分に促進し得るものである。

本発明による細胞が侵入可能な医療用材料は、ヘリックス含有率 0～80%の変性コラーゲンと、該変性コラーゲンよりも酵素分解に対して高い抵抗性を有する担体物質とを含有することを特徴とする。

本発明による第一の人工皮膚は、フィブロインからなる支持層と、該支持層の一方の面に積層された創傷接触層と、前記支持層の他面に積層された水分透過を制御するための水分透過調節層とを具備し、前記創傷接触層がヘリックス含有率 0～80%の変性コラーゲン及び線維化コラーゲンを含むことを特徴とする。線維化コラーゲンは、前記変性コラーゲンよりも酵素分解に対する抵抗性が高い。即ち、この線維化コラーゲンは前記変性コラーゲンの担体物質として機能する。なお、創傷接触層、支持層または水分透過調節層の少なくとも一層に、抗菌剤を含有させるのが好ましい。

本発明による第二の人工皮膚は、架橋構造を有する線維化コラーゲンマトリックスからなる支持層と、該支持層の一方の面に積層された創傷接触層と、前記支持層の他面に積層さ

れて水分透過を制御するための水分透過調節層とを具備し、前記創傷接触層がヘリックス含有率 0～80%の変性コラーゲン及び線維化コラーゲンを含むことを特徴とする。なお、創傷接触層、支持層または水分透過調節層の少なくとも一層に、抗菌剤を含有させるのが好ましい。

本発明による人工皮膚の製造方法は、上記第一または第二の人工皮膚を得る方法である。この方法は、ヘリックス含有率が 0～80%の変性コラーゲン及び線維化コラーゲンを含有する混合溶液を調製する工程と、

該混合溶液の液面にフィブロイン膜または架橋構造を有する線維化コラーゲン膜を載置して凍結乾燥することにより、該フィブロイン膜または線維化コラーゲン膜からなる支持層と前記変性コラーゲン及び線維化コラーゲンを含有する多孔質体からなる創傷接触層との積層体を形成する工程と、

水分透過性膜を与える物質からなる粘着性薄膜を剥離性表面上に形成する工程と、

該粘着性薄膜の上に、前記積層体の前記フィブロイン膜または線維化コラーゲン膜の面を載置する工程と、

前記薄膜が硬化するまで乾燥した後、0.05Torr. 未満の真空下において、50～180℃で 1～24時間加熱処理する工程とを具備している。

なお、変性コラーゲン及び線維化コラーゲンを含有する溶液、フィブロイン膜もしくは架橋構造を有する線維化コラーゲン膜、または粘着性薄膜水分透過調節層の少なくとも何れか一つに抗菌剤を含有させるのが好ましい。



以下に、本発明の詳細を説明する。

細胞が侵入可能な医療用材料

本発明による細胞が侵入可能な医療用材料は、コラーゲンをヘリックス含有率 0～80%にまで変性させることによって、該変性コラーゲン層の内部に細胞が容易に侵入できるようになることの発見に基づいている。

そこで、まずヘリックス含有率 0～80%の変性コラーゲンについて説明する。ヘリックス含有率とは、コラーゲンに特有の三重鎖ヘリックスの含有率をいう。変性コラーゲンでは、この三重鎖ヘリックスの一部または全部がランダムコイル化している。従って、[1-ヘリックス含有率]が変性度に対応する。この変性コラーゲンは、コラーゲンを加熱処理、化学処理、物理処理により変性させて得られる。最も好ましい変性処理は熱処理である。

このような変性コラーゲンは、例えば次のようにして得られる。まず、牛真皮由来のコラーゲン原料を酸またはアルカリで処理し、三重鎖ヘリックスからなるコラーゲンを得る。次いで、これを水の存在下に、50～125℃、好ましくは90～121℃で20分～24時間加熱することにより、ヘリックスをランダムコイルに変性させる。例えば、60℃で30分間熱処理すると、ヘリックス含有率は約40%となる。また、100℃で24時間熱処理すると、ヘリックス含有率は0%となる。なお、上記のヘリックス含有率は、円偏光2色性分光計(CD)または赤外分光光度計で測定することができる(P.L.Gorden et al., Macromoles, 1(6), 954, 1974 ; 奈倉正宜, 橋本, 高分

子論文集, 41(8), 473, 1984)。本願明細書中で用いるヘリックス含有率の値は、この分光学的測定に基づいて算出されたものである。また、電気泳動試験の結果から、上記の変性コラーゲンではコラーゲン分子の一部が切断されていることが分った。

本発明に用いる変性コラーゲンは、上記のようにヘリックス含有率 0～80%のものであるが、より好ましくは、ヘリックス含有率 0～50%のものである。また、コラーゲン分子末端の抗原性を有する部分（テロペプチド）が除去されたものを用いるのが望ましい。このテロペプチドを除去して抗原性を無くしたコラーゲンは、アテロコラーゲン（商品名）として一般に知られている。このアテロコラーゲンは、原料コラーゲンを既述のように酸またはアルカリで処理した後、更にテロペプチドに特異的に作用するペプシンで処理することによって得られる。

上記のように、本発明で用いる変性コラーゲンの分子はヘリックスがランダムコイル化され、且つ一部が途中で切断されているため、細胞が容易に侵入できるものと思われる。その反面、この変性コラーゲンはコラゲナーゼによる分解を受け易い。このため、比較的早期に分解されてしまい、線維芽細胞等が侵入して新たな組織が構築されるまでの時間を十分に確保できない。そこで、本発明の医療材料では生体内の環境において所定の期間、必要な機械的強度を保持させるために、コラゲナーゼ等の酵素分解に対して抵抗性を有する担体物質を併用することとした。この担体物質について次に説明

する。

上記の目的で使用される担体物質は、細胞の侵入が十分に進行するまで分解酵素の作用に抵抗し得、且つ生体に適合し得るものでなければならない。このような物質の例として、ポリエステル、ポリウレタン、塩化ビニルのような合成樹脂が挙げられる。しかし、より好適な担体物質としては、コラーゲン、フィブロイン、ポリ乳酸、ムコ多糖類、アルギン酸のような生体由来物質で且つ最終的には生体に吸収され得る物質が用いられる。特に好ましいのはコラーゲンで、就中、抗原性を示すテロペプチドを除去したアテロコラーゲンが好ましい。

担体物質として用いるコラーゲンは、当然ながら未変性のものである。より好ましくは、架橋構造を挿入したコラーゲンである。コラーゲンに架橋構造を導入する方法としては、常法に従い、コラーゲンを加熱処理する方法または架橋剤で処理する方法を用いることができる。加熱処理による場合は、0.05Torr. 未満の真空下において、50～180℃で1～24時間、好ましくは10～120℃で2～8時間保持することにより脱水する。架橋剤で処理する場合、使用する架橋剤には特に制限はない。例えば、グルタルアルデヒドのようなアルデヒド系架橋剤、ヘキサメチレンジイソシアネートのようなイソシアネート系架橋剤、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩のようなカルボジイミド系架橋剤を使用することができる。

また線維化コラーゲンも、上記の担体物質として好ましく

使用され得る。線維化コラーゲンは、37℃のリン酸緩衝液を用い、三重鎖ヘリックスからなるコラーゲンを中和処理することによって得られる。これにより、水溶性で且つ分散状の三重鎖ヘリックス構造は周期性を有する線維構造に再構成され、コラーゲンは不溶化する。

この線維化コラーゲンに架橋構造を導入したものは、特に好ましい担体物質として使用することができる。分散状の三重鎖コラーゲンは、架橋構造を導入しても機械的強度等の物性はさほど向上しないのに対し、線維化コラーゲンに架橋構造を導入すると、線維化と架橋との相乗作用によって機械的強度等の物性が飛躍的に向上する。架橋構造の導入は、線維化の後に行なう。線維化コラーゲンに導入される架橋度が低すぎると十分な物理的強度が得られず、逆に高すぎるとコラーゲンの構造および好ましい性質が損われる。従って、架橋の程度は種々の条件に応じて適宜設定する必要がある。架橋剤を用いる場合には、一般に0.01～5 % (w/v)、好ましくは1～3 % (w/v) の架橋剤濃度により、適度の架橋度を得ることができる。

本発明の医療用材料では、既述の変性コラーゲンによって優れた細胞侵入性が得られる一方、上記の担体物質を併用することによって、細胞が侵入して真皮様の結合組織が形成されるまで十分な強度を保持することができる。即ち、変性コラーゲン中において、上記の担体物質は酵素の分解作用に抵抗する骨格構造を形成する。また、担体物質としてコラーゲン等の生体由来物質を用いれば、この担体物質も最終的には

酵素作用を受けて分解、吸収される。従って、生体内で完全に同化され得る。なお、担体物質に対する変性コラーゲンの比率は、約 5～80% (w/v)、より好ましくは 10～50% (w/v) である。

本発明の医療用材料は、例えばフィルム上またはスポンジ状等、夫々の用途に応じた形態とすることができる。その際、担体物質は変性コラーゲン中に単に分散されているのみでもよい。また、例えば担体物質をスポンジ状のマトリックスに成形し、該スポンジ状マトリックス中に変性コラーゲンを含浸させた形態とすることもできる。

本発明の医療用材料の製造方法を、担体物質としてコラーゲンを用いる場合について例示すれば次の通りである。但し、コラーゲン以外の担体物質を用いる場合にも、同様の製造方法を用いることができる。

第一の方法では、まずコラーゲン水溶液を調製し、これを二分する。その一方はそのまま放置すると共に、他方は加熱処理することによりコラーゲンを変性させる。こうして得られた変性コラーゲン溶液と未変性コラーゲン溶液とを混合した後、これを所望の形態に成形する。例えば、ソルベントキャスト法によりフィルムに成形してもよく、或いは凍結乾燥法によって多孔性スポンジに成形してもよい。その後、必要に応じてこのフィルムまたはスポンジに熱架橋または化学架橋処理を施す。

第二の方法では、まず、上記で得られた未変性コラーゲン溶液のみを用い、上記と同様の方法で多孔性フィルムまたは

多孔性スポンジを形成する。続いて、このフィルムまたはスポンジ状のマトリックスに熱架橋処理または化学架橋処理を施す。次に、このマトリックスを変性コラーゲン溶液に浸漬した後、取出して自然または真空化で乾燥または凍結乾燥する。

なお、担体物質に対する変性コラーゲンの比率は、約 5～80% (w/v)、より好ましくは10～50% (w/v) である。

### 人工皮膚

本発明の人工皮膚は、上記の細胞侵入性医療用材料を用いた多層複合膜で、典型的には第1図に示すように三層構造の複合膜である。第1図において、1は支持層である。該支持層1の下面には創傷接触層2が積層され、支持層1の上面には水分透過調節層3が積層されている。既述の細胞侵入性医療用材料は、創傷接触層2に用いられる。以下、これら各層について説明する。

#### (1) 創傷接触層2

創傷接触層2には、既述した細胞侵入性医療用材料のうち、担体物質として特に線維化コラーゲンを用いたものを使用する。即ち、創傷接触層2はヘリックス含有率 0～80%の変性コラーゲンと、線維化コラーゲンとからなっている。これらの成分からなる創傷接触層の構成等については、既に詳述したのと同様であるから省略する。当然ながら、この創傷接触層も、医療用材料について既述したと同様、フィルム状またはスポンジ状等の種々の形態とすることができる。担体物質は変性コラーゲン中に単に分散されているのみでもよい。

また、例えば担体物質をスポンジ状のマトリックスに成形し、該スポンジ状マトリックス中に変性コラーゲンを含浸させた形態とすることもできる。

創傷接触層 2 の機能は、創面を直接覆ってこれを柔らかく保護し、痛みを抑え、適度の水分を与え、且つ細菌汚染を防止することである。更に、細胞増殖による組織の新生を促し、治癒を促進することである。上記の細胞侵入性材料からなる創傷接触層 2 はこれらの全ての機能を有しており、就中、組織の新生を促す点で極めて優れている。即ち、創面に適用された際にマクロファージや好中球等の炎症性細胞が浸潤し、早期に線維芽細胞が侵入する。その結果、真皮用の結合組織が構築され、創傷の治癒が促進される。この細胞の侵入については、上記の医療用材料に関して既に詳述したので、ここでは省略する。しかも、この創傷接触層 2 は最終的には全て酵素により分解され、生体に吸収される。従って、従来の人工皮膚のように、治癒後の除去に著しい苦痛を伴うこともない。

## (2) 支持層 1

支持層 1 は、創傷接触層 2 の機械的強度を補強し、また創傷接触層 2 への細胞の侵入を円滑ならしめるためのものである。

既述したように、創傷接触層は線維化コラーゲンの併用によってコラゲナーゼに対する所定の抵抗性を有している。しかし、被覆材としての機械的強度は未だ不充分であり、また最終的には生体に同化されてしまうため、これを外部刺激か

ら保護するための支持体が必要である。従って、支持層 1 には一定以上の機械的強度を有することが要求される。同時に、支持層 1 は創傷接触層 2 への細胞の侵入を阻害するものであってはならない。これらの条件を満たす材料として、第一の人工皮膚ではフィブロインを用いる。また、第二の人工皮膚では架橋構造を導入した線維化コラーゲンを用いる。

フィブロインは生体由来の材料で、絹糸を構成するタンパク質である。絹糸が手術用縫合糸に用いられていることから分るように、フィブロインは生体内安定性の優れたタンパク質である。フィブロインを臭化リチウムや塩化カルシウムのような塩類の濃厚な中性溶液に溶解した後、透析等の方法で塩類を除去することにより、フィブロインの水溶液が得られる。このフィブロイン水溶液を  $-18^{\circ}\text{C} \sim 0^{\circ}\text{C}$  で凍結させた後に解凍すると、 $\beta$  型の結晶構造が形成され、水に不溶の不織布状の多孔質体を得られる（馬越淳，高分子化学，30，582，1973 参照）。この不織布状多孔質体は、架橋構造を導入した通常のコラーゲンよりも生体内での安定性に優れている。従って、長期に亘って創面の被覆に用いられる人工皮膚の支持層として好適に用いることができる。

架橋構造を導入した線維化コラーゲンについては、既に説明した通りである。即ち、線維化コラーゲンに架橋構造を導入すると、線維化と架橋との相乗作用によって機械的強度等の物性が飛躍的に向上する。このため、人工皮膚の支持層として好適に使用することができる。



### (3) 水分透過調節層 3

水分透過調節層 3 は、創面に人工皮膚を適用した際に、創面における水分を調節するためのものである。この調節層 3 で適度な水蒸気透過を確保することにより、創面に滲出液が貯溜するのを防止し、且つ創面を湿潤状態に保持することができる。同時に、滲出液中のタンパク質成分が外部へ漏出するのを防止し、組織修復に好ましい環境を与えることができる。創傷被覆材に水分透過調節層を設けることは従来公知であり、本発明の人工皮膚においてもこれら公知のものを用いることができる。即ち、水分透過調節層 3 としては約  $0.1 \sim 1 \text{ mg/cm}^2/\text{時}$  の水分フラックスを有し、無毒性材料からなる膜を用いることができる。厚さは約  $5 \sim 200 \text{ }\mu\text{m}$  が適している。無毒性材料としてはシリコン樹脂、ポリアクリレートエステル、ポリメタクリレートエステル、ポリウレタン等を使用できる。特に、シリコン樹脂が好適である。

上記の三つの層を有する人工皮膚は、創傷接触層 3 が良好な細胞侵入性および酵素分解に対する適度の抵抗性を有し、支持層 1 によって十分な機械的強度が与えられ、更に水分透過調節層 3 によって創面の適度な水分が維持されるため、人工皮膚として極めて優れた治療効果を奏することができる。特に、創傷接触層 3 において、従来は両立が困難であった細胞侵入性の向上と耐酵素性の維持とが達成されているため、従来の創傷被覆材よりも遥かに優れた治癒促進効果が得られる。

上記第一および第二の人工皮膚の何れにおいても、好まし

い態様においては、創傷接触層 2、支持層 1 および水分透過調節層 3 の少なくとも一層に抗菌剤を含有させる。抗菌剤としてはスルファジアジン銀、ゲンタマイシン、硝酸銀が好適である。しかし、これらに限定されることなく、その他種々の抗菌剤を用いることが可能である。このような抗菌剤を含有させることは、次に述べるように、細菌感染を防止する効果的な手段となる。

広範囲の熱傷または重篤な熱傷（例えばⅢ度熱傷）では、細菌感染を生じ易い。この細菌感染を防止するために、従来は抗菌剤を含有したクリーム基剤が用いられている。しかし、ガーゼまたは包帯等の創傷被覆材と併用する場合、塗布されたクリームの約 57% 程度は滲出液と共にガーゼ等に染み込み、創傷面には約 21% しか到達しない。また、クリーム基剤は毎日のように創傷面に塗り込まねばならず、繁雑な手間を要する。これに対し、本発明の人工皮膚に抗菌剤を含有させておけば、抗菌剤を一定の期間徐々に放出させることができる。従って、創傷面を外気に晒すことなく、且つ抗菌剤を毎日塗布する繁雑さを伴うこともなく、持続的に抗菌剤を作用させることができ、水分透過調節層による細菌侵入防止効果とあいまって、細菌感染を効果的に防止することができる。

なお、水分透過調節層 3 に含有された抗菌剤が放出される状態を調べるために、次の実験を行なった。まず、寸法 5cm × 5cm で膜厚 20 $\mu$ m のシリコーン膜（約 0.15g）に、スルファジアジン銀（AgSD）を夫々 10mg, 20mg, 30mg だけ含有させた試料を作製した。これら夫々の試料を蒸留水 100 ml 中に浸漬

し、溶出したAgSD量を経時的に測定した。その結果を第2図に示す。同図において、横軸は経過時間（日）を示し、縦軸はAgSDの累積溶出量を示す。この結果から、シリコーン膜に含有されたAgSDは徐々に放出され、上記目的を達するに十分な徐放性を有することが分る。

外部からの細菌の侵入を防止することが主目的である場合、何れか一つの層に抗菌剤を含有させるのであれば、水分透過調節層3に含有させるのが好ましい。一方、創面が既に細菌で汚染されており、多量の抗菌剤を創面に供給する必要がある場合には、創傷接触層2または支持層1の何れかに抗菌剤を含浸させるのが望ましい。当然ながら創傷接触層2、支持層1および水分透過調節層のうち、二つまたは三つの層に抗菌剤を含有させてもよい。

#### 人工皮膚の製造方法

本発明による人工皮膚の製造法は、上記第一および第二の人工皮膚のうち、担体物質が変性コラーゲン中に単に分散されている形態の創傷接触層を有するものを効率よく製造するための方法である。この方法は、例えば下記工程a)～d)によって容易に実施することができる。

a) まずコラーゲン水溶液を調製し、これを二分する。その一方はそのまま放置すると共に、他方は加熱処理することによりコラーゲンを変性させる。こうして得られた変性コラーゲン溶液と未変性コラーゲン溶液とを混合する。得られた混合溶液は、創傷接触層に形成に用いるものである。

b) これとは別に、支持層2として用いるためのフィブ

ロイン膜、または架橋構造を導入した線維化コラーゲン膜を形成する。

架橋構造を導入した線維化コラーゲン膜は、既述の方法で製造した架橋線維化コラーゲンの水溶液を凍結乾燥することにより、多孔質スポンジ状の膜とする。

また、フィブロイン膜についても、既に詳述した方法により多孔質膜とする。

c) 次いで、前記混合溶液を所定の容器に収容し、その液面に前記フィブロイン膜または架橋構造を有する線維化コラーゲン膜を載置して凍結乾燥する。これにより、支持層1と創傷接触層2との積層体を得られる。この場合、支持層1はフィブロイン膜または架橋構造を導入した線維化コラーゲン膜であり、創傷接触層2は変性コラーゲン及び線維化コラーゲンを含有する多孔質体層である。

d) テフロン等の剥離性表面を有する基板上に、シリコン等の水分透過性膜を与える物質からなる溶液を延展し、粘着性薄膜を形成する。

e) この粘着性薄膜の上に、支持層1および創傷接触層2からなる前記積層体を載置する。その際、支持層1が粘着性薄膜に接触するように積層体を載置する。

f) 前記粘着性薄膜が硬化するまで乾燥した後、0.05 Torr. 未満の真空下において、50～180℃で1～24時間加熱処理する。これにより前記粘着性薄膜は乾燥され、水分透過調節層3が形成されると同時に、該調節層3は前記支持層1に一体に結合される。こうして、第1図の三層構造からなる

人工皮膚が得られる。

上記のように、本発明の方法によれば別途接着剤を用いることなく、容易に第1図の積層構造からなる人工皮膚を製造することができる。

なお、創傷接触層2を形成するための前記混合溶液、支持層として用いる前記フィブロイン膜もしくは架橋構造を導入した線維化コラーゲン膜、または水分透過性膜を与える物質を含有する前記溶液のうち、少なくとも一つに抗菌剤を含有させておくことにより、既述した抗菌剤含有の好ましい人工皮膚を製造することができる。

#### 〔図面の簡単な説明〕

第1図は、本発明による人工皮膚における多層構造の例を示す断面図である。

第2図は、第1図の人工皮膚における水分透過調節層に含浸された抗菌剤が放出される状態を調べた結果を示すグラフである。

#### 〔実施の最良の形態〕

以下、実施例に従がい、本発明を更に詳細に説明する。

##### 〈A〉 細胞が侵入可能な医療用材料の実施例

##### （実施例1～実施例4）

##### 実施例1 アテロコラーゲン-変性アテロコラーゲンマトリックスの調製

アテロコラーゲン（AC）1.0gをpH3.0の希塩酸に溶解させた。

この溶液を60℃の恒温槽で30分間保持したのち、室

温下で2時間放置して変性アテロコラーゲン（HAC）の溶液を得た。このようにして得られた変性アテロコラーゲンのヘリックス含量は約40%であった。0.3w/v%アテロコラーゲン（pH3.0）溶液を攪拌しながら、0.3w/v%変性アテロコラーゲン溶液を添加し混合した。この溶液をステンレスバットに注入し、そのまま-30℃に急速凍結し、十分凍結した後、-40℃/0.1 トール未満の真空下で凍結乾燥した。さらに生成物を50ミリトール未満の真空下110℃、24時間処理して熱脱水架橋した。

#### 比較例1 アテロコラーゲンマトリックスの調製

アテロコラーゲン（AC） 1.0gを0.3w/v%の濃度になるようにpH3.0の希塩酸に溶解させた。この溶液を上記の方法で凍結乾燥し、さらに熱脱水架橋した。

#### 試験例1 アテロコラーゲン-変性アテロコラーゲンマトリックスのin vitro細胞侵入性試験

上記実施例1、および比較例1で得られたマトリックスについて、ラットの皮膚線維芽細胞を用いてin vitroで培養実験を行ない細胞侵入性の評価を行なった。

60mm滅菌シャーレ〔テルモ（製）〕に直径3.5 cm片のコラーゲンスポンジを置き、線維芽細胞を $1 \times 10^6$  個/mlの濃度で1 ml、スポンジ上に滴下し、24時間37℃下培養する。さらに10% FBSを含むDME培地を3 ml入れ、37℃下で6日間培養した。

10%中性緩衝ホルマリン液で固定後染色を施し、光学顕微鏡で観察し評価した。評価の結果を表1に示した。

表 - 1

コラーゲンマトリックスへの  
in vitro細胞侵入性試験

試 料	細 胞 侵入性	スポンジの 形態保持性
A C	—	⦿
A C - 20重量% H A C	±	⦿
A C - 33重量% H A C	⦿	⦿
A C - 50重量% H A C	⦿	⦿
A C - 67重量% H A C	⦿	⦿
A C - 80重量% H A C	⦿	+

注) 細胞侵入性

— 全 く な し

± 軽 微 に 侵 入

+ 小 規 模 に 侵 入

⦿ 中 程 度 に 侵 入

⦿ 顕 著 に 侵 入

スポンジの形態保持性

消失 (溶解)

ほとんど溶解

検体は残存しているが著しい  
形態変化

小規模の収縮・溶解

形態不変

表-1 から、A C 単独のマトリックスに対し、H A C を  
混合したマトリックスでは、大幅に細胞の侵入性が向上する  
ことが判った。但し、スポンジの形状維持の観点からは、

HACの重量%が80%未満であることが好ましいといえる。

#### 比較例2 線維化アテロコラーゲンの調製

アテロコラーゲン 1.0gをpH3.0の希塩酸に溶解して0.3w/v%にした。この溶液を4℃の恒温槽に入れ攪拌しながら、りん酸緩衝液を加え、終濃度が0.1% (w/v)アテロコラーゲン、30 mMりん酸-2-ナトリウム、100 mM NaClであるコラーゲン溶液を調製した。ついで37℃の恒温槽に1日浸漬し、線維化コラーゲン(FC)液を得た。この液を遠心分離(5000 r.p.m., 10分)して、濃縮し、0.3% (w/v) 線維化アテロコラーゲン(FC)溶液を調製した。この溶液を-30℃で急速凍結した後、凍結乾燥を行ないスポンジを作製した。その後このスポンジを真空下110℃、2時間処理し熱脱水架橋した。

#### 実施例2 線維化アテロコラーゲン-変性アテロコラーゲンマトリックスの調製

上記で調製した0.3% (w/v) 線維化アテロコラーゲン(FC)と1% (w/v)変性アテロコラーゲン(HAC)を37℃で混合し、1時間攪拌した。この溶液を-30℃で急速凍結した後、凍結乾燥を行ないスポンジを作製した。その後、このスポンジを真空下110℃、2時間処理し、熱脱水架橋した。

#### 試験例2 線維化アテロコラーゲン-変性アテロコラーゲンマトリックスのin vitro細胞侵入性試験

上記実施例2、および比較例2で得られたマトリックスについて、試験例1と同様の操作でラットの線維芽細胞を用



いてin vitroで培養実験を行ない、細胞侵入性を評価した。  
評価の結果を表-2に示した。

表 - 2

コラーゲンマトリックスへの  
in vitro細胞侵入性試験

試 料	細 胞 侵入性	スポンジの 形態保持性
F C	+	卄
F C - 10重量% H A C	卄	卄
F C - 20重量% H A C	卄	卄
F C - 50重量% H A C	卄	卄

表-2から、F Cを基材とするマトリックスは、全てスポンジの形態維持が良く、安定性に優れていた。細胞の侵入では、F C単独でも若干の偏在的細胞侵入が見られたものの、H A C添加系では非常に多くの細胞が、しかも均一に分散して侵入しており、スポンジの形状もin vitro培養実験系でありながらin vivoの生体組織に近い様相を呈していた。

試験例3 線維化アテロコラーゲン-変性アテロコラーゲン  
マトリックスのin vivo 皮下埋入試験

実施例2、および比較例2で作製したマトリックスをラット皮下に埋入し、病理学的に組織像を検索する。

皮下埋植（埋入）には、約200gのwistar-KY系、雌性ラットを用いる。埋入前に、5倍希釈ネンブタールで麻酔後ラットの背面を手術用のイソジン液（明治製菓（株）製）で濡らし、毛刈り用カミソリで毛の刈り残しがないように、背面を注意深く剃毛する。その後、剃られた背面をイソジンとエタノールで消毒する。各々の切り込みから、ラットの皮筋下の疎性結合織内に空隙を作るように切り込みを広げる（ただし、隣接する切り込み同士は連絡しないように配慮する。）。この空隙に検体をさし込み、検体全体が平らに横たわるようにする。角針付ナイロン糸で切り口を縫合する。切り口は3針縫う。同じ検体を別のラットにも同様にして埋入する。

埋入後3, 28日目に動物をエーテルあるいは2倍希釈ネンブタールを用いて殺す。埋入検体が組織中に溜まっているようにして、ラットの背筋上の皮膚組織を8cm×12cmあるいはそれ以上の大きさに切り取る。この組織を10%中性緩衝ホルマリン溶液中に置き、一昼夜放置し固定後、病理組織検索を施す。

病理組織検索は組織からの検体の切り出しに始まる。検体が確実に含まれるように、組織を0.5cm×2.5cm程度のたんざく状に切り出す。これをエタノール、次にキシレンで透徹し、最後にパラフィンに置換する。置換後、固型パラフィンの加熱溶解液に、検体を含む組織を置き、急冷してパラフィン包埋を完了する。包埋された組織は、ヤマト（株）製回転式ミクロトームにて薄切を行ない、厚さ4 $\mu$ mのパラフィ

ン切片とする。これを脱パラフィンした後、任意の染色法で病理組織染色を行ない、プレパラートを完成する。病理組織染色として、ヘマトキシリン－エオジン（H・E）染色、アザン染色、レゾルシン－フクシン染色等を採用できる。結果を表－3に示した。

表 - 3

## 皮下埋入試験の病理組織変化

試 料	組 織 変 化		
	3 日 目		2 8 日 目
	好 中 球 浸 潤	線 維 芽 細胞侵入	肉芽組織 の 萎 縮
F C	卅	卅	卅
F C - 10重量% H A C	+	卅	+
F C - 20重量% H A C	卅	卅	+
F C - 50重量% H A C	卅	卅	+

F C だけでは、3日目においては好中球浸潤が強くかつ線維芽細胞の侵入は中等度であり、28日目においては、出来上がった肉芽組織が萎縮している。それに対し、H A C が10ないし20重量%はいる事により3日目における好中球浸潤は弱く、逆に線維芽細胞侵入は、一層良好となる。さらに28日目における肉芽組織の萎縮も著しく緩和される事が

明らかである。

### 実施例3 変性コラーゲンを被覆した架橋コラーゲンの調製

比較例2で得た線維化アテロコラーゲン（FC）凍結乾燥スポンジを0.01%および1%ヘキサメチレンジーイソシアネート（HDI）=エタノール溶液に1昼夜浸漬し、化学架橋を導入した。それぞれのスポンジに実施例1で得られた変性コラーゲン（HAC）水溶液を30ml添加し、十分浸漬後再び凍結乾燥してスポンジ化し、それぞれを真空下、110℃で2時間加熱処理、および24時間加熱処理を施し、熱脱水架橋を導入した。こうして、変性コラーゲン（HAC）を被覆したコラーゲンマトリックスを得た。最終的な組成比はHACが10重量%となるようにした。

### 比較例3 架橋コラーゲンの調製

実施例3のうち、変性コラーゲン（HAC）水溶液の添加の過程を省いた、単独の線維化アテロコラーゲン（FC）のみの凍結乾燥スポンジ（架橋の導入は実施例3と同一）を比較例3として用意した。

### 試験例4 変性コラーゲン被覆架橋コラーゲンマトリックスのin vivo 皮下埋入試験

実施例3および比較例3で作製したマトリックスを、試験例3の手法に準じてラット皮下に埋入し、病理・組織学的検索に付す。但し、試料は7日後、14日後に取り出した。結果を表-4に示した。

表 - 4

皮下埋入試験の病理組織変化

試料	架橋条件	7日後および14日後での組織変化		
		好中球浸潤	線維芽細胞侵入	自己組織化
FC	0.01% HD I 架橋 + 熱架橋 2 時間	+	-	-
HAC被覆FC	"	+	+	+
FC	1% HD I 架橋 + 熱架橋 2 時間	±	-	-
HAC被覆FC	"	+	+	+
FC	1% HD I 架橋 + 熱架橋 24 時間	-	-	-
HAC被覆FC	"	+	+	+

それぞれ比較例として置いたFCは、一部好中球等の浸潤もあるものの、細胞成分自体の浸潤が、炎症性および網内系細胞も含め、極めて悪い。それに比して、それぞれHACを被覆したFCは、細胞成分の浸潤が甚だ良好で、それに伴って一部自己組織化も行なわれており、中には異物反応がやや強いものもあるものの、特にHAC被覆FC 0.01% HDI 架橋+熱架橋2時間の試料に至っては好中球浸潤すら既に少ない極めて真皮に近い構造を試料の部位に再構築しており、当発明の目的等を考えても最も理想に近いマトリックスであると言える。

#### 実施例4 シリコン膜含有コラーゲンスポンジの調製

テフロン上に50% Silastic シリコン接着剤型A (Dow Corning 社製) のヘキサン溶液を精密被覆用具 (アプリケーター) を用いて塗布し製膜した。塗布した直後に実施例3によって製造したスポンジをのせ、室温で10分程放置した後、60℃で少なくとも1時間オープンで硬化させた。

#### 試験例5 皮膚欠損創への移植試験

実施例4により製造したスポンジを使用して、ラットの皮膚欠損創への移植試験を行なった。ラット背部皮膚に皮下筋膜を創面とする全創皮膚欠損創 (2 cm × 2 cm) を作製し、シリコン膜を表層に付与した検体を結紮縫合した。動物は移植後4週目に殺し、移植物と傷床を切り取り、病理検索を施した。4週目では創収縮はあまり見られず、良好な肉芽組織が形成し、表皮再生が見られた。

## 〈B〉 人工皮膚およびその製造方法の実施例

### 実施例5

#### 1) 創傷接触層の調製

##### 線維化コラーゲン-変性コラーゲンマトリックスの調製

アテロコラーゲン 1.0 g を pH3.0 の希塩酸に溶解して 0.3w/v% にした。この溶液を 4℃ の恒温槽に入れ攪拌しながら、りん酸緩衝液を加え、終濃度が 0.1w/v% アテロコラーゲン、30 mM りん酸-2-ナトリウム、100 mM NaCl であるコラーゲン溶液を調製した。ついで、37℃ の恒温槽に 1 日浸漬し、線維化コラーゲン (FC) 液を得た。この液を遠心分離 (5000 r.p.m., 10 分) して濃縮し、0.3w/v% 線維化アテロコラーゲン (FC) 溶液を調製した。一方、1.0 % のアテロコラーゲン (pH3.0 塩酸) 溶液を 60℃ の恒温槽で 30 分間処理したのち、室温下で 2 時間放置して変性アテロコラーゲン (HAC) の溶液を得た。上記で調製した溶液を 37℃ で混合し、1 時間攪拌した。この溶液を -30℃ で急速凍結した後、凍結乾燥を行ないスポンジを作製した。

#### 2) フィブロインマトリックスの調製

8M リチウムブロマイド水溶液に、精練絹糸を溶解し、これをセロハンチューブに入れ、水に対して透析を行なった。リチウムブロマイドが完全に除去されたことを確認したのち、得られたフィブロイン水溶液をポリスチレン容器に流し込み、-10℃ で 24 時間凍結させた。その後、室温で解凍し、不

織布状になっていることを確認して、凍結乾燥した。

### 3) 創傷被覆材の調製

上記1) で得た、コラーゲン-変性コラーゲンの混合溶液をステンレスバットに注入し、さらに上記2) で調製したフィブロインのマトリックスのスポンジをゆっくりのせ、この状態で-30℃に急速凍結して、十分凍結した後、凍結乾燥すると二層構造のスポンジが得られた。次にテフロン上に50%Silasticシリコーン接着剤型A (Dow Corning 社) のヘキサン溶液を精密被覆用具 (アプリーケーター) を用いて塗布して製膜した。塗布した直後に上記のスポンジをフィブロインマトリックスがシリコーン側になるようにのせ、室温で10分程放置した後、60℃で少なくとも1時間オープンで硬化させた。さらに真空下で1時間真空にし、さらに110℃に温度を上げ、2時間真空に保ち、その後温度を室温まで下げ、試料を取り出して創傷被覆材を得た。

### 実施例6

実施例5の3) において、コラーゲン-変性コラーゲンの混合溶液50ccにスルファジアジン銀の粉末を25mg加え、十分に攪拌して、ステンレスバットに注入した。さらに、フィブロインのマトリックスをゆっくりのせ、この状態で-30℃に急速凍結して十分凍結した後、凍結乾燥することにより抗菌剤含有の二層構造からなるスポンジが得られた。このスポンジにシリコーン膜を上記と同様にしてラミネートして抗菌剤含有の創傷被覆材を得た。



## 実施例 7

### 1) 線維化アテロコラーゲンの調製

アテロコラーゲン 1.0 g を pH3.0 の希塩酸に溶解して 0.3w/v% にした。この溶液を 4℃ の恒温槽に入れ攪拌しながら、りん酸緩衝液を加え、終濃度が 0.1w/v% アテロコラーゲン、30 mM りん酸-2-ナトリウム、100 mM 塩化ナトリウムであるコラーゲン溶液を調製した。ついで 37℃ の恒温槽に 1 日浸漬し、線維化アテロコラーゲン (FC) 溶液を調製した。この溶液を -30℃ で急速凍結した後凍結乾燥を行ないスポンジを作製した。

### 2) 変性アテロコラーゲン溶液の調製

アテロコラーゲン 1.0 g を pH3.0 の希塩酸に溶解させた。この溶液を 60℃ の恒温槽で 30 分処理した後、室温下で 2 時間放置して変性アテロコラーゲン (HAC) 溶液を得た。このようにして得られた変性アテロコラーゲンのヘリックス含量は約 40% であった。

### 3) 線維化アテロコラーゲン-変性アテロコラーゲンマトリックスの調製

上記で調整した 0.3w/v% 線維化アテロコラーゲン (FC) と 1w/v% 変性アテロコラーゲン (HAC) を 37℃ で混合し、1 時間攪拌した。この溶液を -30℃ で急速凍結した後、凍結乾燥を行ない、スポンジを作製した。

### 4) 線維化アテロコラーゲンマトリックスの熱脱水架橋

上記 1) の生成物を 0.05 トール未満の真空下で 1 時間真空にし、さらに 110℃ に温度を下げ、2 時間真空に保ち、

その後温度を室温まで下げ、試料を取り出した。

5) 線維化アテロコラーゲンマトリックスのイソシアネート架橋

上記1)の生成物を0.01%ヘキサメチレンジイソシアネート (HDI) のエタノール溶液に室温下で24時間浸漬することにより架橋した。さらに未架橋のイソシアネートを除去する為に水洗を数回行ない、凍結乾燥した。

6) 線維化アテロコラーゲン-変性アテロコラーゲンマトリックスの熱脱水架橋

上記3)の生成物を0.05トール未満の真空下で1時間真空にし、さらに110℃に温度を下げ、2時間あるいは24時間真空に保ち、その後温度を室温まで下げ、試料を取り出した。

7) 各種コラーゲンマトリックスのin vivo 皮下埋入試験  
(試験例6)

上記で得られたマトリックスをラットの皮下に埋入し、病理学的に組織像を検索した。皮下埋植には、約200gのwistar-KY系、雌性ラットを用いた。埋入前に、5倍希釈ネンブタールで麻酔後ラットの背面を手術用のイソジン液(明治製菓(株)製)で濡らし、毛刈り用カミソリで毛の刈り残しがないように、背面を注意深く剃毛した。その後、剃られた背面をイソジンとエタノールで消毒した。各々の切り込みから、ラットの皮筋下の疎性結合組織内に空隙を作るように切り込みを広げた。この空隙に検体をさし込み、検体全体が平らに横たわるようにした。角針付ナイロン糸で切り口を縫合

した。切り口は3針縫った。同じ検体を別のラットにも同様にして埋入した。埋入後3, 28日目に動物をエーテル或いは2倍希釈ネンブタールを用いて殺した。埋入検体が組織中に留まっているようにして、ラットの背筋上の皮膚組織を8 cm × 12 cm 或いはそれ以上の大きさに切り取った。この組織を10%中性緩衝ホルマリン溶液中におき、一昼夜放置し固定後、病理組織検索を施した。

検体が確実に含まれるように組織を0.5 cm × 2.5 cm 程度のたんざく状に切り出した。これをエタノール、次にキシレンで透徹し、最後にパラフィンに置換した。置換後、固型パラフィンの加熱溶解液に検体を含む組織を置き、急冷してパラフィン包埋を完了した。包埋された組織はヤマト（株）製回転式ミクロトームにて薄切を行ない、厚さ4 μm のパラフィン切片とした。これを脱パラフィンした後、任意の染色法で病理組織染色を行ない、プレパラートを調製した。病理組織染色として、ヘマトキシリン-エオジン（H・E）染色、アザン染色、レゾルシン-フクシン染色等を採用した。結果を表5に示す。

表 - 5

## 皮下埋入試験の病理組織変化

試 料	架 橋 法	組 織 変 化		
		3 日 目		2 8 日 目
		好中球浸潤	線維芽細胞侵入	肉芽組織の萎縮
FC	0.01% HD I (室温, 24H)	-	-	-
FC	熱脱水架橋 (110 °C, 2H)	#	#	#
FC-10重量% H A C	熱脱水架橋 (110 °C, 2H)	+	#	+
FC-20重量% H A C	熱脱水架橋 (110 °C, 2H)	+	#	+
FC-50重量% H A C	熱脱水架橋 (110 °C, 2H)	#	#	+
FC-10重量% H A C	熱脱水架橋 (110 °C, 24H)	#	+	#

- : negative, + : slight, # : moderate, # : severe

H A Cは60°C、30分処理

F C だけでは、3日目においては好中球浸潤が強く、かつ線維芽細胞の侵入は中程度であり、28日目においては、出来上がった肉芽組織が萎縮していた。それに対し、H A C が10ないし20重量%入る事により3日目における好中球浸潤は弱く、逆に線維芽細胞侵入は一層良好となる。さらに28日目における肉芽組織の萎縮も著しく緩和される事が明らかになった。

#### 8) 人工皮膚の調製

上記3)において線維化アテロコラーゲン濃度を1.0 v/v %に調製して、線維化アテロコラーゲン-変性アテロコラーゲンの混合溶液をステンレスバットに注入し、さらに上記5)で調製した0.01% H D I で架橋した線維化アテロコラーゲンマトリックスのスポンジをゆっくりのせると、スポンジは溶液の上層部に浮く。この状態で-30℃に急速凍結して、十分凍結した後、-40℃/0.1 トール未満の真空下で凍結乾燥すると、線維化アテロコラーゲンマトリックスと線維化アテロコラーゲン-変性アテロコラーゲンマトリックスからなる二層構造のスポンジが得られた。次にテフロン上に50% Silastic シリコーン接着剤型A (Dow Corning 社) のヘキサン溶液を精密被覆用具 (アプリーケーター) を用いて塗布し製膜した。塗布した直後に上記のスポンジを線維化アテロコラーゲンマトリックスがシリコーン側になるようにのせ、室温で10分程放置した後、60℃で少なくとも1時間オープンで硬化させた。さらに0.05トール未満の真空下で1時間真空にし、さらに110℃に温度を上げ、2時間真空に

保ち、その後室温を室温まで下げ、試料を取り出して人工皮膚を得た。

9) 人工皮膚のラット皮膚欠損創への移植試験 (試験例7)

上記で得られたマトリックスをラットの背部皮膚に移植して試験した。wistar-KY系ラット (200~400g) をネンブタール麻酔下で除毛し、イソジン消毒したラット背部皮膚に皮筋を創面とする20×20mmの全創皮膚欠損創を作製し、止血、乾燥した後、生食を含ませた検体をそれぞれ貼付した。シリコーン膜辺縁を縫合糸で16ヶ所結紮固定した。その上に、ソルフレン (テルモ製) を4枚重ね、さらにエラストコン等の伸縮性絆創膏で胴巻にし圧迫固定した。観察は1, 2, 3, 4週間後にそれぞれ行ない、移植4週間後について剖検を行ない、病理組織学的に検索した結果を表6に示した。

表 - 6

移植試験における肉眼的・病理学的所見

試 料		創収縮	4週間後の組織変化	
上層部マトリックス	下層部マトリックス		肉芽組織	表皮形成
FC (0.01% HDI 架橋)	FC-10重量% HAC (熱脱水架橋 2H)	弱い	疑似真皮様肉芽*1	あり
FC (0.01% HDI 架橋)	FC-10重量% HAC (熱脱水架橋 2H)	弱い	疑似真皮様肉芽	あり
FC (0.01% HDI 架橋)	—	弱い	炎症性肉芽*2	なし
FC-10重量% HAC (熱脱水架橋 2H)	—	強い	単純肉芽*3	あり
未処理	—	極めて強い	単純肉芽	あり

\*1 摺曲した太いコラーゲン線維束からなり、その間隙に毛細血管と線維芽細胞がびまん性に散在する組織。

\*2 残存コラーゲン線維とそれを貧食しつつある巨細胞・組織球および線維芽細胞とそれが産生するわずかなコラーゲンとからなる。

\*3 主に線維芽細胞とそれが産生する単純な構造の疎なコラーゲン線維からなる肉芽組織。

## 実施例 8

### 1) 抗菌剤含有コラーゲンスポンジの作製

pH3.0 の 0.3 % アテロコラーゲン溶液にりん酸緩衝液を加え、37℃で4時間恒温槽に入れ、線維化アテロコラーゲンを調製した。線維化アテロコラーゲン 50 cc を攪拌しながら、スルファジアジン銀の粉末を 25 mg, 50 mg, 250 mg と 500 mg をそれぞれ加え、十分に分散させた後、スチロール型バット (10 cm × 10 cm) に流し込み、凍結乾燥した。更に出来上がったスポンジを真空下 110℃, 2時間架橋処理を施した。

### 2) 抗菌剤含有コラーゲンスポンジの作製

pH3.0 の 0.3 % アテロコラーゲン溶液にりん酸緩衝液を加え、37℃で4時間恒温槽に入れ、線維化アテロコラーゲンを調製した。この溶液を凍結乾燥してスポンジ化し、更に 0.01% ヘキサメチレンジイソシアネートのエタノール溶液に 1日浸漬させ架橋した。架橋したコラーゲンスポンジ (10 cm × 10 cm) を硝酸銀のアンモニア溶液 ( $1 \times 10^{-3}$  モル/l) 100 ml に浸漬した。

### 3) 抗菌剤含有コラーゲンスポンジの作製

実施例 2 で得られた硝酸銀のアンモニア溶液に浸漬したコラーゲンスポンジを更にナトリウムスルファジアジン溶液 ( $1 \times 10^{-3}$  モル/l) 100 ml に浸漬した。

### 4) 抗菌性の評価 (試験例 8)

Muller-Hinton Agar (Difco 社製) をオートクレーブにかけた後 50℃ に保ち、20 ml ずつシャーレに分注し、1時



間室温に放置し固めた。菌は平板で培養した後、トリス緩衝液中に各種の菌を懸濁して菌液とし、倍地上に綿棒で3回ずつ全体に塗布した。上記の方法で調製した試料を直径8 mmに切りぬき、菌を塗布した倍地上に置き、37℃で18時間培養した。結果を表7に示した。

いずれの菌株も0.25mg/cm<sup>2</sup>以上の配合で、濃度に依存せずほぼ同等の阻止円を形成した。

表 - 7

## 抗菌剤含有コーラゲンスポンジの抗菌性

単位 ; mm

試料 菌名	AgSD 0 mg/cm <sup>2</sup>	AgSD 0.25mg/cm <sup>2</sup>	AgSD 0.5 mg/cm <sup>2</sup>	AgSD 2.5 mg/cm <sup>2</sup>	AgSD 5.0 mg/cm <sup>2</sup>	Ag(NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> N a S D
Ps.aeruginosa	0 0	11.64 11.52	11.64 10.85	10.43 10.50	11.64 12.32	10.68
St.epidermidis	0 0	12.59 12.93	14.04 12.39	12.96 12.67	13.17 13.22	9.51
E. Coli	0 0	11.38 12.78	12.17 12.98	11.74 11.58	10.80 11.65	10.32
C. albicans	0 0	17.13 17.81	17.23 15.58	15.57 15.55	17.15 16.03	9.31

#### 5) 抗菌剤含有人工皮膚の作製

実施例 1 において線維化アテロコラーゲン溶液を 1.0 w/v % に調製し、変性アテロコラーゲン溶液を添加し、十分に攪拌しながらスルファジアジン銀を 2.5 mg 加え、スチロールバットに注入し、更に 0.01% H D I で架橋した線維化アテロコラーゲンスポンジをゆっくりのせ凍結乾燥した。次にテフロン上に 50% Silastic シリコン接着剤型 A (Dow Corning 社) のヘキササン溶液を精密被覆用具を用いて塗布し製膜した。塗布した直後に上記のスポンジをのせ、60℃で少なくとも 1 時間オープンで硬化させた。更に真空下で 1 時間真空にし、更に 110℃に温度を上げ、2 時間真空に保ち、その後温度を室温まで下げ、試料を取り出して抗菌剤含有人工皮膚を得た。

### 請求の範囲

1. ヘリックス含有率 0～80%の変性コラーゲンと、該変性コラーゲンよりも酵素分解に対して高い抵抗性を有する担体物質とを含有することを特徴とする細胞が侵入可能な医療用材料。

2. 前記変性コラーゲンは、コラーゲン分子末端の抗原性を有する部分が除去されている請求の範囲第1項に記載の医療用材料。

3. 前記担体物質が、コラーゲン、フィブロイン、ポリ乳酸、ムコ多糖類、アルギン酸からなる群から選択される請求の範囲第1項に記載の医療用材料。

4. 前記担体物質が未変性コラーゲンである特許請求の範囲第3項に記載の医療用材料。

5. 前記担体物質は、分子末端の抗原性を有する部分が除去されたコラーゲンである請求の範囲第3項に記載の医療用材料。

6. 前記担体物質は、架橋構造が導入されたコラーゲンである請求の範囲第3項に記載の医療用材料。

7. 前記担体物質が線維化コラーゲンである請求の範囲第3項に記載の医療用材料。

8. 前記線維化コラーゲンは、架橋構造が導入されたものである請求の範囲第7項に記載の医療用材料。

9. 形態がフィルム状である請求の範囲第1項に記載の医療用材料。

10. 前記担体物質は前記変性コラーゲン中に分散されて

いる請求の範囲第 9 項に記載の医療用材料。

1 1. 形態がスポンジ状である請求の範囲第 1 項に記載の医療用材料。

1 2. 前記担体物質はスポンジ状マトリックスに成形され、該スポンジ状マトリックス中に前記変性コラーゲンが含まれている請求の範囲第 1 1 項に記載の医療用材料。

1 3. 前記担体物質に対する変性コラーゲンの比率が、約 5~80% (w/v) である請求の範囲第 1 項に記載の医療用材料。

1 4. フィブロインからなる支持層と、該支持層の一方の面に積層された創傷接触層と、前記支持層の他面に積層された水分透過を制御するための水分透過調節層とを具備し、前記創傷接触層がヘリックス含有率 0~80% の変性コラーゲン及び線維化コラーゲンを含むことを特徴とする人工皮膚。

1 5. 前記線維化コラーゲンは、コラーゲン分子末端の抗原性を有する部分が除去されている請求の範囲第 1 4 項に記載の人工皮膚。

1 6. 前記創傷接触層の形態がスポンジ状である請求の範囲第 1 4 項に記載の医療用材料。

1 7. 前記創傷接触層において、前記線維化コラーゲンは前記変性コラーゲン中に分散されている請求の範囲第 1 4 項に記載の人工皮膚。

1 8. 前記創傷接触層において、前記担体物質はスポンジ状マトリックスに成形され、該スポンジ状マトリックス中に前記変性コラーゲンが含まれている請求の範囲第 1 4 項に記載の人工皮膚。

19. 前記支持層を構成するフィブロインが、水に不溶の不織布状の多孔質体である請求の範囲第14に記載の人工皮膚。

20. 前記水分透過調節層が、シリコーン樹脂、ポリアクリレートエステル、ポリメタクリレートエステル及びポリウレタンからなる無毒製物質で形成されている請求の範囲第14に記載の人工皮膚。

21. 前記水分透過調節層が、約0.1 ~ 1 mg/cm<sup>2</sup>/時の水分フラックスを有する請求の範囲第14項に記載の人工皮膚。

22. 創傷接触層、支持層または水分透過調節層の少なくとも一層に、抗菌剤を含有させた請求の範囲第14項に記載の人工皮膚。

23. 前記抗菌剤がスルファジアジン銀、ゲンタマイシンおよび硝酸銀からなる群から選択される請求の範囲第22項に記載の人工皮膚。

24. 架橋構造を有する線維化コラーゲンマトリックスからなる支持層と、該支持層の一方の面に積層された創傷接触層と、前記支持層の他面に積層されて水分透過を制御するための水分透過調節層とを具備し、前記創傷接触層がヘリックス含有率 0~80%の変性コラーゲン及び線維化コラーゲンを含むことを特徴とする人工皮膚。

25. 前記線維化コラーゲンは、コラーゲン分子末端の抗原性を有する部分が除去されている請求の範囲第24項に記載の人工皮膚。

26. 前記架橋構造を導入された線維化コラーゲンは、コ

ラーゲン分子末端の抗原性を有する部分が除去されている請求の範囲第24項に記載の

27. 前記創傷接触層の形態がスポンジ状である請求の範囲第24項に記載の医療用材料。

28. 前記創傷接触層において、前記線維化コラーゲンは前記変性コラーゲン中に分散されている請求の範囲第24項に記載の人工皮膚。

29. 前記創傷接触層において、前記担体物質はスポンジ状マトリックスに成形され、該スポンジ状マトリックス中に前記変性コラーゲンが含まれている請求の範囲第24項に記載の人工皮膚。

30. 前記架橋構造を導入した線維化コラーゲンからなる支持層が、多孔質のスポンジ状である請求の範囲第24項に記載の人工皮膚。

31. 前記水分透過調節層が、シリコン樹脂、ポリアクリレートエステル、ポリメタクリレートエステル及びポリウレタンからなる無毒製物質で形成されている請求の範囲第24項に記載の人工皮膚。

32. 前記水分透過調節層が、約 $0.1 \sim 1 \text{ mg/cm}^2/\text{時}$ の水分フラックスを有する請求の範囲第24項に記載の人工皮膚。

33. 創傷接触層、支持層または水分透過調節層の少なくとも一層に、抗菌剤を含有させた請求の範囲第24項に記載の人工皮膚。

34. 前記抗菌剤がスルファジジン銀、ゲンタマイシンおよび硝酸銀からなる群から選択される請求の範囲第33項

に記載の人工皮膚。

35. ヘリックス含有率が 0～80%の変性コラーゲン及び線維化コラーゲンを含有する混合溶液を調製する工程と、該混合溶液の液面にフィブロイン膜または架橋構造を有する線維化コラーゲン膜を載置して凍結乾燥することにより、該フィブロイン膜または線維化コラーゲン膜からなる支持層と前記変性コラーゲン及び線維化コラーゲンを含有する多孔質体からなる創傷接触層との積層体を形成する工程と、水分透過性膜を与える物質からなる粘着性薄膜を剥離性表面上に形成する工程と、該粘着性薄膜の上に、該薄膜と前記フィブロイン膜または線維化コラーゲン膜が接触するように前記積層体を載置する工程と、前記薄膜が硬化するまで乾燥した後、0.05Torr. 未満の真空下において、50～180℃で 1～24時間加熱処理する工程とを具備したことを特徴とする人工皮膚の製造方法。

36. 前記フィブロイン膜または架橋構造を有する線維化コラーゲン膜が、多孔質スポンジ状の膜である請求の範囲第11項に記載の方法。

37. 変性コラーゲン及び線維化コラーゲンを含有する溶液、フィブロイン膜もしくは架橋構造を有する線維化コラーゲン膜、または粘着性薄膜水分透過調節層の少なくとも何れか一つに抗菌剤を含有させる請求の範囲第6項に記載の方法。

38. 前記抗菌剤がスルファジジン銀、ゲンタマイシンおよび硝酸銀からなる群から選択される請求の範囲第37項に記載の方法。



1/1

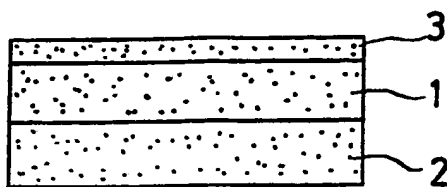


Fig. 1.

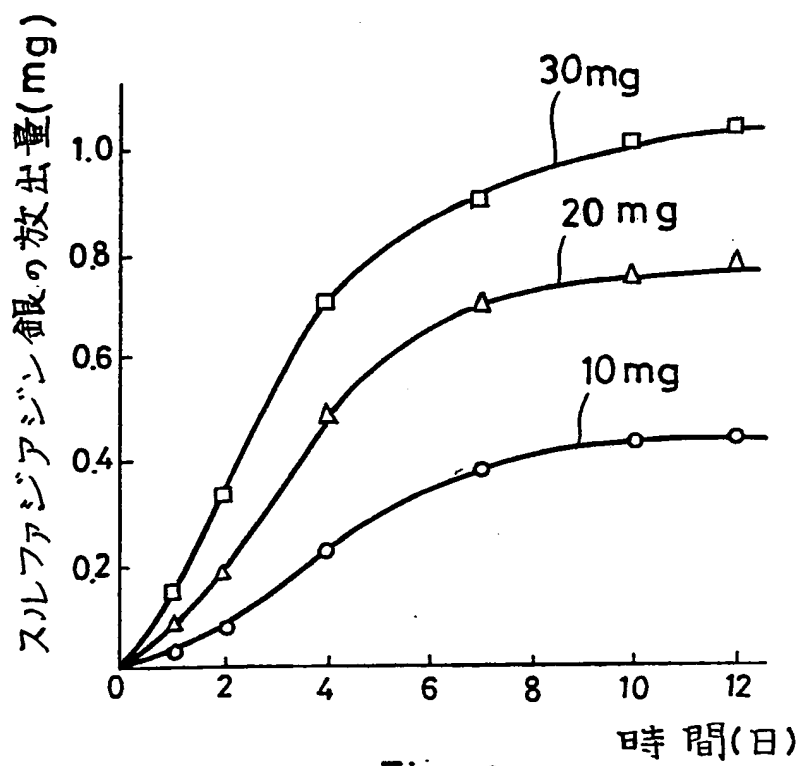


Fig. 2.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/JP89/00257

<b>I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> (if several classification symbols apply, indicate all) <sup>6</sup> According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC  <div style="text-align: center; font-size: 1.2em;">Int. Cl.<sup>4</sup> A61L27/00</div>											
<b>II. FIELDS SEARCHED</b>  <div style="text-align: center; font-size: 0.8em;">Minimum Documentation Searched <sup>7</sup></div> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 25%; padding: 5px;">Classification System</td> <td style="padding: 5px;">Classification Symbols</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 10px;">IPC</td> <td style="text-align: center; padding: 10px;">A61L27/00</td> </tr> </table> <div style="text-align: center; font-size: 0.8em; margin-top: 5px;">Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched <sup>8</sup></div>			Classification System	Classification Symbols	IPC	A61L27/00					
Classification System	Classification Symbols										
IPC	A61L27/00										
<b>III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <sup>9</sup></b> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="width: 10%; padding: 5px;">Category <sup>*</sup></th> <th style="width: 70%; padding: 5px;">Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup></th> <th style="width: 20%; padding: 5px;">Relevant to Claim No. <sup>13</sup></th> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 10px;">A</td> <td style="padding: 10px;">JP, A, 58-121958 (Collagen Corporation) 20 July 1983 (20. 07. 83) &amp; US, 4424208</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 10px;">1-8</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 10px;">A</td> <td style="padding: 10px;">JP, A, 61-154567 (Seikagaku Kogyo Kabushiki Kaisha) 14 July 1986 (14. 07. 86) (Family: none)</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 10px;">1-8</td> </tr> </table>			Category <sup>*</sup>	Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup>	Relevant to Claim No. <sup>13</sup>	A	JP, A, 58-121958 (Collagen Corporation) 20 July 1983 (20. 07. 83) & US, 4424208	1-8	A	JP, A, 61-154567 (Seikagaku Kogyo Kabushiki Kaisha) 14 July 1986 (14. 07. 86) (Family: none)	1-8
Category <sup>*</sup>	Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup>	Relevant to Claim No. <sup>13</sup>									
A	JP, A, 58-121958 (Collagen Corporation) 20 July 1983 (20. 07. 83) & US, 4424208	1-8									
A	JP, A, 61-154567 (Seikagaku Kogyo Kabushiki Kaisha) 14 July 1986 (14. 07. 86) (Family: none)	1-8									
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p><sup>*</sup> Special categories of cited documents: <sup>10</sup></p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p> </div> </div>											
<b>IV. CERTIFICATION</b> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%; padding: 5px;">Date of the Actual Completion of the International Search</td> <td style="width: 50%; padding: 5px;">Date of Mailing of this International Search Report</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 10px;">May 29, 1989 (29. 05. 89)</td> <td style="text-align: center; padding: 10px;">June 6, 1989 (05. 06. 89)</td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">International Searching Authority</td> <td style="padding: 5px;">Signature of Authorized Officer</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 10px;">Japanese Patent Office</td> <td></td> </tr> </table>			Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report	May 29, 1989 (29. 05. 89)	June 6, 1989 (05. 06. 89)	International Searching Authority	Signature of Authorized Officer	Japanese Patent Office		
Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report										
May 29, 1989 (29. 05. 89)	June 6, 1989 (05. 06. 89)										
International Searching Authority	Signature of Authorized Officer										
Japanese Patent Office											

国 際 調 査 報 告

国際出願番号PCT/JP 89 / 0 0 2 5 7

I. 発明の属する分野の分類		
国際特許分類 (IPC) <b>Int. Cl.<sup>4</sup></b> <b>A 6 1 L 2 7 / 0 0</b>		
II. 国際調査を行った分野		
調 査 を 行 っ た 最 小 限 資 料		
分 類 体 系	分 類 記 号	
<b>IPC</b>	<b>A 6 1 L 2 7 / 0 0</b>	
最小限資料以外の資料で調査を行ったもの		
III. 関連する技術に関する文献		
引用文献の カテゴリー ※	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	請求の範囲の番号
<b>A</b>	<b>JP, A. 58-121958</b> <b>(コラーゲン・コーポレーション)</b> <b>20. 7月. 1983 (20. 07. 83)</b> <b>&amp; US, 4424208</b>	<b>1~8</b>
<b>A</b>	<b>JP, A. 61-154567 (生化学工業株式会社)</b> <b>14. 7月. 1986 (14. 07. 86) (ファミリーなし)</b>	<b>1~8</b>
<p>※ 引用文献のカテゴリー</p> <p>「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの</p> <p>「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの</p> <p>「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)</p> <p>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献</p> <p>「T」 国際出願日又は優先日の後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</p> <p>「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「&amp;」 同一パテントファミリーの文献</p>		
IV. 認 証		
国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日	
<b>29. 05. 89</b>	<b>05.06.89</b>	
国際調査機関	権限のある職員	<b>4 C 6 9 7 1</b>
<b>日本国特許庁 (ISA/JP)</b>	<b>特許庁審査官</b>	<b>吉 村 康 男 ®</b>